

**New enzyme composition useful for anaerobic digestion of sewage sludge, comprises at least three different enzymes or enzyme activities and surfactants and/or degradation promoters**

**Patent number:** DE19845207  
**Publication date:** 2000-04-20  
**Inventor:** KERY KAROLY (DE)  
**Applicant:** KERY KAROLY (DE)  
**Classification:**  
- **International:** C12N9/00; C12N9/14; C02F11/04; C12P5/02  
- **European:** C12N9/14; C02F3/34  
**Application number:** DE19981045207 19981001  
**Priority number(s):** DE19981045207 19981001

**Abstract of DE19845207**

An enzyme composition (I), comprising 70 - 95 weight % of at least three different enzymes or an enzyme with at least three activities, 0.1 - 25 weight % surfactants and/or 0.1 - 10 weight % degradation promoters, is new.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

**New enzyme composition useful for anaerobic digestion of sewage sludge, comprises at least three different enzymes or enzyme activities and surfactants and/or degradation promoters**

Legal status (INPADOC) of DE19845207

<b>DE F</b>	<b>19845207 A</b>	(Patent of invention)
<b>PRS Date :</b>	2000/04/20	
<b>PRS Code :</b>	OP8	
<b>Code Expl.:</b>	+ REQUEST FOR EXAMINATION AS TO PARAGRAPH 44 PATENT LAW	

<b>PRS Date :</b>	2002/01/24
<b>PRS Code :</b>	8131
<b>Code Expl.:</b>	- REJECTION



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

● **Offenlegungsschrift** ●  
⑩ **DE 198 45 207 A 1**

⑤1 Int. Cl.<sup>7</sup>:  
**C 12 N 9/00**  
C 12 N 9/14  
C 02 F 11/04  
C 12 P 5/02

②1 Aktenzeichen: 198 45 207.1  
②2 Anmeldetag: 1. 10. 1998  
④3 Offenlegungstag: 20. 4. 2000

DE 198 45 207 A 1

⑦1 Anmelder:  
Kéry, Karoly, Dipl.-Ing., 40667 Meerbusch, DE

⑦4 Vertreter:  
Kutzenberger & Wolff, 50668 Köln

⑦2 Erfinder:  
gleich Anmelder

⑤6 Entgegenhaltungen:  
US 43 38 399  
WO 98 28 410 A1  
WO 95 25 707 A1

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 Enzympräparation für die Verbesserung der Bioabbaubarkeit von Biomasse

DE 198 45 207 A 1

Die Erfindung betrifft eine Enzympräparation zur Verbesserung der Bioabbaubarkeit von Biomasse.

Der Bioabbau von organischen Abfällen pflanzlicher, tierischer oder mikrobieller Herkunft, wie z. B. Blätter, Gras, Stroh, Küchenabfälle, Schweinegülle, biologische Klärschlämme usw. ist ein mehrstufiger Vorgang, bei dem die höhermolekularen organischen Stoffe zunächst teilweise hydrolysiert, dann je nach Milieubedingungen entweder aerob zum Kohlendioxid und Wasser oxidiert oder unter mikroaeroben bzw. anaeroben Bedingungen von säurebildenden Bakterien zu flüchtigen Carbonsäuren umgewandelt werden, welche unter anaeroben Bedingungen durch die Aktivität von methanogenen Bakterien über das Zwischenprodukt Acetat zum etwa 65% Methan und 35% Kohlendioxid enthaltenden Biogas als Endprodukt zerfallen. Diese biochemischen Reaktionen laufen in der Natur wegen der chemischen und physikalischen Eigenschaften der Substrate, die ihnen eine Hydrolysestabilität verleihen, relativ langsam ab.

Bedingt durch die hohe Hydrolysestabilität der Bestandteile der Schlammflocke sowie der nicht ausreichenden Aktivität der hydrolytischen Enzyme reichen beispielsweise bei industriellen Klärschlämmen auch relativ lange Faulungszeiten von 25 bis 40 Tagen für eine gute Ausfäulung der Schlämme nicht aus.

Für die Verkürzung der Vergärungszeit bzw. Verbesserung der Ausfäulung wurden in der Vergangenheit verschiedene Maßnahmen vorgeschlagen. Die meisten von ihnen haben die Erhöhung der Hydrolysegeschwindigkeit der Biomasse bzw. des Substrates zum Ziel. Diese Maßnahmen haben jedoch auch ihre Nachteile. Die alkalische oder saure Hydrolyse kann beispielsweise zur Aufsalzung des Substrates sowie zur Entstehung biologisch schlecht abbaubarer Zwischenprodukte führen. Eine thermische Vorbehandlung ist energieaufwendig und bedeutet einen zusätzlichen apparativen Aufwand.

Die Verbesserung der Ausfäulung durch Zusatz verschiedener Enzyme wurde ebenfalls vorgeschlagen.

G. Higgins und Mitarbeiter beschreiben in "Energy from Biomass and Wastes", Ausgabe 9 (1985, S. 791-810), eine 6-stündige Behandlung von Vorklärschlamm bei 35°C unter Zugabe von 2.500 mg Cellulase pro Kilogramm Trockensubstanz mit anschließender Fäulung, wobei eine um 12% höhere Faulgasproduktion festgestellt wurde. Die ziemlich hohe Cellulasedosis beeinträchtigt die Wirtschaftlichkeit dieser Methode nicht unerheblich.

In der Studie Nr. PTWT 02 WS 86196 des Bundesministeriums für Forschung und Technologie wird auf den Seiten 97 bis 101 über eine 10 bis 15%ige Erhöhung der Biogasproduktion durch die Zudosierung von 20 ml eines Enzympräparates auf Proteasebasis pro Kubikmeter Rohschlamm berichtet. Die angegebene Behandlungsdauer von etwa drei Wochen ist jedoch für eine Leistungsbeurteilung nicht ausreichend. In "Water Research" Nr. 23 (1989), 11, 1455-1459, wird über den Versuch berichtet, die Schlammfäulung durch Zusatz von 16 bis 160 g pro Kubikmeter einer Mischung aus enzymatisch hochaktiven, hydrolysierenden selektierten Kulturen zu verbessern, jedoch wurde auch nach dreimaliger Wiederholung keine Verbesserung festgestellt.

In Anbetracht der großen Bedeutung der anaeroben Vergärung von organischen Schlämmen und Abfällen bestand ein großer Bedarf nach einer schnelleren und besseren Ausfäulung mit einem höheren Abbaugrad der organischen und anorganischen Feststoffanteile.

Diese Aufgabe konnte durch die erfindungsgemäße Enzympräparation gelöst werden.

Gegenstand der Erfindung ist eine Enzympräparation für die Verbesserung der Bioabbaubarkeit von Biomasse bestehend aus:

- A) 70 bis 95 Gewichtsteilen einer Enzymmischung
- B) 0,1 bis 25 Gewichtsteilen oberflächenaktiver Stoffe und/oder
- C) 0,1 bis 10 Gewichtsteilen abbauverbessernder Additive,

wobei die Summe der Gewichtsanteile 100 ergibt.

A) Enzymmischung bedeutet bei der erfindungsgemäßen Enzympräparation eine Mischung von mindestens drei hydrolytischen Enzymen oder ein Enzym mit mindestens drei verschiedenen ausgeprägten Aktivitäten. Eine bevorzugte Enzymmischung ist dabei die mit den Aktivitäten als Cellulase, Hemicellulase ( $\beta$ -Glucanase und Endo-Xylanase) und Protease.

Als besonders bevorzugte Enzymmischung ist die mit den Aktivitätsanteilen von 10% bis 30% Cellulase, 5% bis 30% Protease und 50% bis 80% Hemicellulase.

Als besonders wirksam erwies sich eine aus *Trichoderma viride* hergestellte Cellulase mit den Nebenaktivitäten, die in folgenden Verhältnissen zueinander stehen: Cellulase = 15.000 U/ml (bestimmt an Hydroxyethylcellulose als Substrat);  $\beta$ -Glucanase = 70.000 U/ml; Endo-Xylanase = 10.000 U/ml; - Protease = 3.500 U/ml Amyloglucosidase = 1.000 U/ml).

B) Oberflächenaktive Stoffe bedeuten eine Mischung solcher oberflächenaktiver Stoffe, die den Kontakt und damit auch die Wechselwirkung des höhermolekularen Enzyms mit dem ungelösten, meistens hydrophoben Substrat verbessern, bzw. den Stoffaustausch beschleunigen. Dazu gehören Stoffe bzw. Mischungen von Stoffen mit unterschiedlichen Eigenschaften, wie:

- Lösungsvermittler, die sowohl zu hydrophilen als auch zu hydrophoben Partikeln oder Suspensa eine Affinität aufweisen, wie z. B. Alkohole (Ethanol, Isopropanol) oder Diole (Ethandiol, Diethylenglykol, Triethylenglykol) usw.
- Tenside, die sowohl die Benetzung von weniger hydrophilen suspendierten Partikeln, als im Fall von mikrobiellen Zellen auch eine Beschleunigung der Stoffdiffusion durch die Zellwand ermöglichen. Hierzu zählen in erster Linie biologisch abbaubare, die Enzymreaktion nicht hemmende anionische, nicht ionische oder kationische Tenside.

C) Abbauverbessernde Additive bedeuten solche Nährstoffe, Spurenelemente, Vitamine sowie andere Zusätze, deren Anwesenheit im Milieu auf die einzelnen Schritte des Abbauprozesses durch Mikroorganismen beschleunigend wirken: Die Anwesenheit von zweiwertigen Eisenionen führt zur Bindung des unter den reduktiven Bedingungen der Anaero-

biose aus Sulfationen gebildet. Inhibierend wirkenden Schwefelwasserstoffs. Die Spurenelemente Cobalt und Nickel in gelöster Form üben eine positive Wirkung auf die Anaerobiose aus. Das Methanol wirkt in kleinen Mengen als biologisch leicht konvertierbare C<sub>1</sub>-Verbindung stimulierend auf die methanogenen Bakterien, besonders unter für diese inhibierenden Bedingungen.

Die optimalen Einsatzmengen der Enzympräparation liegen zwischen 200 mg bis 1.200 mg pro Kilogramm organischer Trockenmasse und liegen somit bei der Anwendung zur Verbesserung der Schlammfäulung wesentlich niedriger als bei der von Higgings und Mitarbeitern beschriebenen Cellulase. Eine Erhöhung der Einsatzmenge führt oft nicht zur Erhöhung, sondern überraschend zur Verringerung des Bioabbaus des organischen Substrates. Obwohl die erfindungsgemäße Präparation Enzyme mit bekannten Eigenschaften enthält, führt der Einsatz der Mischung überraschend und unerwartet zu höheren Abbaugraden als die gleichen Mengen von den einzelnen Enzymen allein. Die erfindungsgemäße Präparation wird bei kontinuierlich betriebenen Bioreaktoren entweder in den Vorlagebehälter der Zulaufvorrichtung oder bei zweistufigen Verfahren auch in den ersten, den sogenannten Versäuerungsreaktor, wo optimale Bedingungen herrschen, oder kann bei einstufigen Verfahren auch direkt in den Bioreaktor, bevorzugt in das Umwälzsystem, kontinuierlich oder halbkontinuierlich zudosiert werden.

Folgendes Beispiel dient zur Erläuterung der Erfindung.

#### Beispiel 1

In zehn Erlenmeyerkolben mit je 1.000 ml Fassungsvermögen wurden jeweils 600 ml eingedickter kommunaler Klärschlamm sowie jeweils 200 ml bereits ausgefauter Klärschlamm eingefüllt und nach der Durchmischung die Trockensubstanz sowie deren organischer Anteil bei jedem Kolben bestimmt. In die einzelnen Kolben wurden unterschiedliche Mengen der beiliegend beschriebenen Enzyme A und B bzw. weitere Additive eingewogen. Danach wurden die Erlenmeyer verschlossen, bei 35°C ± 2°C thermostatiert und einer anaeroben Gärung überlassen. Das dabei gebildete Biogas wurde über eine Kanüle entnommen und über einen Schlauch in eine Gasbürette geleitet, wo das gebildete Gasvolumen täglich registriert wurde. Nach 20 Tagen wurde die Fäulung abgebrochen und die Trockenmasse bzw. deren organischer Anteil der einzelnen ausgefauten Schlämme bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt.

Cellulase	A	(aus	Trichoderma	viride)
Aktivitäten:	Cellulase	1.500	U/g	
	α-Amylase	500	U/g	
	Pectinase	100	U/g	
	Xylanase	500	U/g	
	Protease	3.000	U/g	

Cellulase	B	(aus	Trichoderma	viride)
Aktivitäten:	Cellulase	15.000	U/g	
	β-Glucanase	70.000	U/g	
	Endo-Xylanase	11.000	U/g	
	Saure Protease	3.500	U/g	
	Amyloglucosidase	1.000	U/g	

Tabelle 1

Verbesserung der anaeroben Schlammfäulung durch Enzyme und Enzympräparationen

Nr.	Enzym	Dosierung (mg/kg O. T. S.)	Rohschlamm (g/l)		Faulschlamm (g/l)		Abbaugrad %		Σ Biogas (ml) In 20 Tagen
			T. S.	O. T. S.	T. S.	O. T. S.	T. S.	O. T. S.	
1	—	Nullversuch	26,94	17,40	22,87	13,28	15,12	23,68	5070
2	Cellulase A	2200	26,51	17,12	21,95	12,36	17,21	27,81	5235
3	Cellulase B	570	26,36	17,07	21,52	11,57	18,35	33,22	5700
4	Cellulase B	1870	26,80	17,23	21,90	11,48	18,32	32,80	5125
5	Protease	555	27,02	17,48	22,68	13,02	16,06	25,50	5390
6	Protease	1820	27,48	17,81	22,82	13,03	16,95	26,85	5175
7	Cellulase B + Protease 1 : 1	585	27,10	17,60	21,40	11,57	21,05	34,25	5975
8	Cellulase B + Protease 2 : 1	547	27,40	18,00	21,11	11,36	22,95	36,88	6740
9	Cellulase B + Protease 2 : 1 + 1 mg/l CO + 20 mg/l Fe <sub>2</sub> +	560	26,97	17,75	20,83	11,24	22,77	36,67	6880
10	Cellulase B + Protease 2 : 1 + CoO/Fe wie bei Nr. 9 + 0,5 ml/l CH <sub>3</sub> OH	555	27,25	17,90	20,80	11,07	23,70	38,15	6950

T. S. = Schlammrockensubstanz

O. T. S. = organische Schlammrockensubstanz

1. Enzympräparation bestehend aus  
70 bis 95 Gewichtsteilen einer Mischung von mindestens drei verschiedenen Enzymen oder einem Enzym mit mindestens drei Aktivitäten 5  
0,1 bis 25 Gewichtsteilen oberflächenaktiver Stoffe und/oder  
0,1 bis 10 Gewichtsteilen abbauverbessernder Additive, wobei die Summe der Gewichtsteile 100 ergibt.
2. Enzympräparation nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß die Enzymmischung Aktivitäten als Cellulase, Protease und Hemicellulase aufweist, wobei die Aktivitätsanteile bei 10% bis 30% Cellulase, 5% bis 30% Protease und 50% bis 80% Hemicellulase ( $\beta$ -Glucanase und Endo-Xylanase) liegen. 10
3. Enzympräparation nach Anspruch 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, daß als Cellulase ein Produkt aus *Trichoderma viride* verwendet wird, deren Aktivitäten in folgenden Verhältnissen zueinander stehen: Cellulase = 15.000 U/ml :  $\beta$ -Glucanase = 3.500 U/ml : Endo-Xylanase = 11.000 U/ml : Protease = 3.500 U/ml : Amyloglucosidase = 1.000 U/ml.
4. Enzympräparation nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß als oberflächenaktiver Stoff eine Mischung aus bioabbaubaren Tensiden verwendet wird. 15
5. Enzympräparation nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die abbauverbessernden Additive Eisen-, Cobalt- und Nickelsalze sowie Methanol enthalten.
6. Verwendung der Enzympräparation nach Anspruch 1 bis 5 für die Verbesserung der Bioabbaubarkeit von organischem Material pflanzlicher, tierischer und mikrobieller Herkunft unter anaeroben, aeroben oder fakultativen Bedingungen, dadurch gekennzeichnet, daß die eingesetzte Menge 200 bis 1.200 mg Enzympräparation pro kg organischer Trockensubstanz, bevorzugt 300 bis 1.000 mg Enzympräparation pro kg organischer Trockensubstanz, besonders bevorzugt 400 bis 900 mg Enzympräparation pro kg organischer Trockensubstanz, beträgt. 20
7. Verwendung der Enzymmischung nach Anspruch 2 für die Verbesserung der Bioabbaubarkeit von organischem Material pflanzlicher, tierischer und mikrobieller Herkunft unter anaeroben, aeroben und fakultativen Bedingungen. 25
8. Verwendung der Cellulase aus *Trichoderma viride*, mit den Aktivitäten in Verhältnissen zueinander: Cellulase = 15.000 U/ml :  $\beta$ -Glucanase = 70.000 U/ml : Endo-Xylanase = 11.000 U/ml : Protease = 3.500 U/ml : Amyloglucosidase = 1.000 U/ml für die Verbesserung der Bioabbaubarkeit von organischem Material pflanzlicher, tierischer und mikrobieller Herkunft unter anaeroben, aeroben und fakultativen Bedingungen. 30

35

40

45

50

55

60

65